# Beiträge zur Kenntnis

der

# Bestandteile und Wirkungen der Lupinensamen.

---

Inaugural-Dissertation

der

Medizinischen Fakultät zu Rostock

vorgelegt von

**Gustav Muenk.**

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

**Merseburg.**
Druck von Friedrich Stollberg.
1914.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät zu Rostock.

Referent: Herr Geh. Med.-Rat Prof. Dr. KOBERT.

## I. Historisches über die Lupine.

Schon unter den wenigen Arzneimitteln der Hippokratischen Schule spielte nach R. v. Grot[1]) die Wolfsbohne eine Rolle. Sie wurde als thermos bezeichnet. Ihre Samen galten als Stomachikum und als Abführmittel. Nach Francis Adams[2]) waren den Griechen und Römern zwei Sorten unserer Pflanze, Lupinus sativus und Lupinus silvestris, geläufig. G. Dragendorff[3]) erklärt den thermos agrios der Hippokratiker für Lupinus hirsutus. Der alte M. Portius Cato nennt in den Anweisungen an seinen Sohn die Lupine als eine Pflanze, die auf den sandigsten und daher unfruchtbarsten Stellen seines Landgutes vortrefflich gedeihe. Sein scharfer Blick eilte damit der Landwirtschaftswissenschaft um zwei Jahrtausende voraus. Bekanntlich entdeckte erst Hellriegel in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts, dass in der Tat die Lupine ihren Stickstoff nicht aus Düngemitteln zu nehmen braucht, sondern aus der Luft nimmt, denn die in ihren Wurzelknöllchen vorhandenen sogen. Wurzelbakterien wandeln freien Stickstoff erst

---

[1]) R. v. Grot, Historische Studien aus dem Pharmak. Inst. zu Dorpat; herausgegeben von R. Kobert, Bd. 1 (Halle 1889), S. 95.

[2]) Francis Adams, The seven books of Paulus Aegineta, vol. 3 (London 1847), S. 136.

[3]) Georg Dragendorff, Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten (Stuttgart 1898), S. 310.

in salpetrige Säure und dann in Salpetersäure bezw. deren Salze um, die nun dem Stengel zufliessen. Unter den Bittermitteln, welche vor der Erfindung des Hopfenbieres dem Bier der alten Ägypter mindestens zwei Jahrtausende hindurch zugesetzt wurden, spielte auch eine Lupine eine Rolle. WÖNIG nennt Lupinus thermis als in Ägypten einheimisch und weist darauf hin, dass in diesem Lande noch heutigen Tages daraus Lupinenbier gebraut wird. DIOSKURIDES und GALEN zählen viele Indikationen auf, welche den Gebrauch von Lupinensamen rätlich erscheinen lassen. Die Schriftsteller der arabischen Periode, wie RHAZES, SERAPION und AVICENNA reden in demselben Sinne; PAULUS VON AEGINA[1]) schliesst sich ihnen an. In einer der ältesten mittelalterlichen Arzneitaxen, die der Magister der Medizin PÜRCKL VON SCHÖNGRABEN[2]) um 1440 irgend woher kopierte, finden sich die Lupinensamen als Semen Lupi ebenfalls.

Das Angeführte zeigt, dass unsere Samen schon Jahrtausende lang bekannt sind und teils als Arzneimittel, teils wenigstens als Genussmittel eine Rolle gespielt haben.

Unser Zeitalter benutzt sie teils zur Gründüngung, teils als Viehfutter. Zu letzterem Zweck werden sie häufig erst entbittert, d. h. zur Entfernung löslicher bitterer Stoffe mit Wasser extrahiert. Über die Lupinenvergiftung wird in einem späteren Kapitel berichtet werden.

## II. Über die Lupinenalkaloide.

In den Samen aller bis jetzt untersuchten Lupinenarten finden sich Alkaloide, allerdings nicht in allen Arten dieselben. Sie enthalten nach WILLSTÄTTER und FOURNEAU sämtlich einen Kern von zwei kombinierten Pyrrolidinringen.

1. Das wichtigste und am stärksten wirkende Alkaloid ist sauerstofffrei, flüssig und flüchtig. Es wurde von LIEBSCHER als Lupinidin bezeichnet. Später musste dieser Name zurückgezogen werden, da es sich als identisch mit dem schon 1851 von J. STENHOUSE dargestellten Spartein $C_{15}H_{26}N_2$ des Besenginsters erwies. Dieses Alkaloid findet sich nach ERNST SCHMIDT

[1]) PAULUS VON AEGINA, Des besten Arztes sieben Bücher, übersetzt und erläutert von JUL. BERENDES (Leiden 1914), S. 649.

[2]) Siehe bei J. SCHWARZ, Pharmaz. Post 1893, S. 4 des Sep.-Abdr.

in Lupinus luteus und Lupinus niger. Sparteinsalze werden als Herzmittel arzneilich vereinzelt benutzt. Über die Nützlichkeit dieser Behandlung gehen die Ansichten auseinander.

2. Neben dem Spartein findet sich in den genannten zwei Lupinenarten nach Ernst Schmidt[1]) stets auch noch das Alkaloid Lupinin $C_{10}H_{19}NO$.

3. Ein drittes Alkaloid, das Lupanin $C_{15}H_{24}N_2O$ (racemisches und linksdrehendes), findet sich in Lupinus albus, Lupinus angustifolius und Lupinus perennis. Es lässt sich in zwei neue Basen zerlegen, von denen die eine mit dem Tropin isomer ist. Die beiden letztgenannten, präformierten Alkaloide, das Lupinin und Lupanin, sind zwar recht bitter, aber ihre Giftigkeit ist gering. Mit der gleich noch zu besprechenden Lupinose haben die drei Alkaloide gar nichts zu tun. Wenn Julius Schmidt[2]) das Spartein zur Lupinose in Beziehung setzt oder zu setzen scheint, so kann dem nicht beigestimmt werden. Das Lupinin wirkt schwach lähmend auf Gehirn und Medulla oblongata; das Lupanin wirkt ähnlich.

## III. Über die sogen. Lupinose.

In sämtlichen Teilen der in Mitteleuropa gebauten Lupinenpflanzen und nicht etwa nur in den Samen, ja vielleicht in diesen relativ wenig, fand sich in einigen Jahren der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts der gewöhnlichen Annahme nach ein chemisch bis jetzt noch recht wenig studiertes Gift, von Julius Kühn Iktrogen, von anderen als Lupinotoxin bezeichnet. Es lässt sich durch Extraktion der zerkleinerten Pflanzenteile mit verdünnten Sodalösungen oder genauer gesagt mit allen Alkalien ausziehen. Das Auftreten dieses Giftes war meist ein regionäres, ganze Provinzen betreffendes. Tausende von Schafen sind ihm wiederholt zum Opfer gefallen. Die Wirkungen dieses, namentlich von Kobert[3]) im Auftrage von Julius Kühn mit Liebscher, studierten Giftes sind von denen der genannten Alkaloide durchaus verschieden. Es handelt sich beim Iktrogen

[1]) E. Schmidt, Archiv der Pharmazie Bd. 235, 1897, S. 192; Bd. 242, 1904, S. 409.

[2]) Jul. Schmidt, Die Alkaloidchemie in den Jahren 1904—1907 (Stuttgart 1907), S. 36.

[3]) R. Kobert, Lehrbuch der Intoxikationen, zweite Aufl., Teil 2 (Stuttgart 1906), S. 586.

um einen das Blut tiefgreifend zersetzenden, Somnolenz machenden Vorgang, bei dem intensivste Gelbsucht (daher der Name Iktrogen) der Haut, aller innere Organe und des Harns auftritt. Gleichzeitig degenerieren die Organe, namentlich Leber, Nieren, Herz und Skelettenmuskeln analog wie bei akuter gelber Leberatrophie und bei schwerer Phosphorvergiftung; in die lebensunfähig werdenden Zellen lagert sich reichlich Fett ein. Entfernt man dies, so findet man vom Protoplasma und vom Kern nur noch Trümmer oder auch gar nichts mehr. Dass ein Schrumpfungsstadium auf die Leberdegeneration und Fettinfiltration folgen kann, scheint sicher, jedoch konnte KOBERT ihn nie feststellen, da die Tiere teils auf der Höhe der Vergiftung spontan zugrunde gingen, teils von den Besitzern getötet wurden. In den letzten Jahrzehnten ist diese hochinteressante aber von den Landwirten sehr gefürchtete Krankheit nicht mehr vorgekommen. KÜHN hat die Vermutung ausgesprochen, dass ein Befallspilz die Ursache ist. Aufkochen setzt nämlich die Giftigkeit der Lupinen bald auf Null herab. Ausser Schafen wurden auch Rinder, Pferde, Schweine und Dammwild gelegentlich befallen. Experimentell liess sich die Krankheit durch Verfüttern solcher Lupinen auch an Kaninchen erzeugen. Das klinische Bild haben FRIEDBERGER und FRÖHNER in ihrem Lehrbuche der spec. Path. u. Ther. der Haussäugetiere geschildert. Eine genügende Erklärung der Krankheit hat noch niemand geliefert.

## IV. Über ein säurebildendes Ferment der Lupinensamen.

Bei meinen Versuchen war es notwendig bei 38° die zerkleinerten Lupinensamen bei neutraler Reaktion unter Zusatz von Toluol mit physiol. Kochsalzlösung zu extrahieren. Den dabei von mir zunächst gesuchten Stoff, das Lupinenphasin, werde ich in einem späteren Kapitel besprechen. Hier sei vorher ein anderer Stoff erwähnt, den ich ausnahmslos bei jeder solchen Verarbeitung der Samen von Lupinus albus, von Lupinus luteus *L.* und von der blauen Lupinus nebenbei mit fand, nämlich ein milchsäurebildendes Enzym.[1]) Die säurebildende Kraft dieses Enzyms war eine geradezu erstaunliche. Wenn ich eben

[1]) Über enzymatische Milchsäurebildung siehe NEUBERG, Biochem. Ztschr. Bd. **55**, 1913, S. 501; DAKIN und DUDLEY, ebenda Bd. **59**, 1914, S. 193; Journ. of Biolog. Chem. Bd. **14**, 1913, S. 155, 324, 423, 555; Bd. **15**, 1913, S. 127, 463.

mit Natrium carbonicum das Gemisch im Brüteschrank neutralisiert hatte, war nach einer halben Stunde schon wieder reichlich Säure vorhanden. Binnen zwölf Stunden verbrauchte ich zur Neutralisierung eines Auszuges von 100 g Samenpulver der gelben Lupine mit 500 ccm physiol. Kochsalzlösung das eine Mal 144 ccm $^1/_{40}$-Normalnatronlauge und ein anderes Mal sogar 180 ccm derselben Lauge. Bei der weissen Lupine verbrauchte ich bei dem einzigen Male, wo ich quantitativ verfuhr, für 100 g Samen 132 ccm der $^1/_{40}$-Normalnatronlauge. Eine erste kurze Destillation der Kolatur aus schwefelsaurer Lösung ergab nur Spuren flüchtiger Säuren. Auch die Ausschüttelung in Äther löslicher Säuren misslang zunächst. Da es aber doch grosses Interesse haben musste, festzustellen, um welche Säure es sich hier handelt, wurden weitere Untersuchungen unter Beihilfe von Dr. Sieburg angestellt, über die ich jetzt genauer berichten will.

100 g fein zermahlene gelbe Lupinen werden mit 300 ccm physiologischer NaCl-Lösung und einigen Tropfen Toluol versetzt und 24 Stunden hindurch bei 38° im Thermostaten gehalten. Zu Anfang wird die gebildete Säure alle 1—2 Stunden mit $^1/_{10}$-n. NaOH neutralisiert. Zu Ende der Digestion waren im ganzen 48.8 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH, das sind fast genau 2 g festes Natronhydrat, verbraucht.

Eine zweite Portion von ebenfalls 100 g wird in der gleichen Weise behandelt, nur wird die gebildete Säure erst am Schlusse der Digestion in einem aliquoten Teile neutralisiert; hierzu werden 47.2 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH auf das ganze berechnet, verbraucht; ein wesentlicher quantitativer Unterschied bezüglich der gebildeten Säure besteht hiernach also nicht. Der saure Auszug rötete Lakmus intensiv, war aber auf Kongo und Tropäolin ohne Einwirkung. — Ein abgemessener Teil wurde weiter 40 Minuten lang im lebhaften Wasserdampfstrom destilliert: das Destillat verlangte auf die ganze Menge Ausgangsmaterial berechnet 16.3 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH. Flüchtige Fettsäuren konnten in diesem Destillat durch Spezialreaktionen nicht nachgewiesen werden. Dagegen gab eine Probe mit ganz verdünntem Eisenchlorid eine deutliche Gelbfärbung. Eine weitere Probe des saueren Auszuges wurde nun wiederholt mit reichlich Äther ausgeschüttelt, dieser verdunstet und der saure Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen: auch hier trat auf Zusatz von $FeCl_3$ eine Gelbfärbung ein, die noch deutlicher war, wie die

oben erwähnte. Hierdurch schien die Gegenwart von Milchsäure recht wahrscheinlich. Sichergestellt sollte sie durch die Darstellung ihres Calciumsalzes und dessen Identifizierung werden.

Der Rest des sauren Auszuges wurde mit viel Alkohol versetzt und die abfiltrierte wässrig-alkoholische Flüssigkeit mit überschüssiger Kalkmilch auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Durch wiederholtes abwechselndes Aufnehmen mit starkem heissen Alkohol und Wasser wurden endlich kleinste zu Büscheln angeordnete Nädelchen erhalten, deren Menge zur Analyse aber nicht ausreichte.

Es wurde deshalb von neuem 100 g Lupinenmehl mit Wasser wie oben angesetzt und nach und nach während der 12stündigen Reaktionszeit Kalkmilch bis zur alkalischen Reaktion hinzugegeben. Das Filtrat wurde abgedunstet und der Verdunstungsrückstand durch sehr häufiges abwechselndes Aufnehmen mit Alkohol und Wasser gereinigt. Nach endlichem Umkrystallisieren aus 50 %igem Alkohol bei Zimmertemperatur hinterblieben schneeweisse blumenkohlartige Massen.

Bei 110 ° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet verloren 0.6434 g Substanz 0.1930 g $H_2O$ und gaben beim Glühen 0.1148 g CaO; d. i. 30.05 % $H_2O$ und 12.7 % Ca.

Berechnet für $[CH_3—CH(OH)—COO]_2Ca$, $5H_2O$ ergibt sich $H_2O = 29.2$ %, Ca = 13.0 %.

---

200 g weisse Lupinen werden gemahlen und 2 Stunden hindurch mit 400 ccm Kochsalzlösung bei 38 ° digeriert, dann abgepresst und die Flüssigkeit durch Glaswolle koliert und die Kolatur mit $1^1/_2$ l Alkohol, der zu 10 % Äther enthält, gefällt. Nach 4stündigem Absitzenlassen wird die überstehende Alkohol-Ätherschicht abgehebert und der Rückstand in einer flachen Schale bei 38 ° zur Trockne gebracht.

Von diesem Trockenrückstand wird die Hälfte über Nacht mit 100 ccm Kochsalzlösung bei 38 ° digeriert und dann filtriert. Der bei weitem grösste Teil des Rückstandes geht nicht mehr in Lösung. Von der klaren Lösung werden je 5 ccm abpipettiert und in Reagenzgläsern mit einer kleinen Messerspitze der nachstehenden Kohlehydrate versetzt. Jedes Röhrchen erhält als Antisepticum ausserdem soviel Toluol, dass die überstehende Schicht überall ungefähr $^1/_2$ cm hoch ist. Die so beschickten Gläser werden 24 Stunden hindurch bei 38 ° gehalten und dann

wird aus jedem Glas vorsichtig mit der Pipette 2 ccm entnommen und nach dem Verdünnen mit 25 ccm Wasser unter Anwendung von Phenolphtalein als Indikator mit $^1/_{10}$-n. NaOH die Azidität bestimmt.

Jeder Kubikzentimeter-Auszug der folgenden Versuche entspricht dem Ferment aus etwa einem Gramm weissen Lupinensamen.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 ccm | Auszug | (als | Kontrolle) | | bindet | 0.2 ccm | $^1/_{10}$-n. NaOH. |
| „ | „ | „ | „ | | „ | 0.25 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Mannit . . . . | | „ | 0.3 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Inulin . . . . | | „ | 0.3 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Rohrzucker . . | | „ | 0.5 „ | „ „ |
| „ | „ | + | d-Galaktose . . | | „ | 0.5 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Maltose. . . . | | „ | 0.5 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Traubenzucker . | | „ | 0.55 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Glykogen . . . | | „ | 0.6 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Stärke . . . . | | „ | 0.65 „ | „ „ |
| „ | „ | + | Milchzucker . . | | „ | 1.05 „ | „ „ |

Diese Versuche machen es sehr wahrscheinlich, dass in den Samen der weissen Lupine ein aus Amylum Milchsäure bildendes Ferment enthalten ist, dessen fermentative Kraft in diesem Versuche für Milchzucker besonders stark ist, aber auch für Stärke beträchtlich ist. Ausserdem werden auch Glykogen, Traubenzucker, Maltose, d-Galaktose und Rohrzucker in Milchsäure umgewandelt, während Inulin und Mannit nicht beeinflusst werden. Nach der Nomenklatur von Edm. v. Lippmann würde man dies Ferment als Amylo-Lactacidase zu bezeichnen haben.

Ist dies Ferment nun sicher ein Enzym oder ist es mikrobischer Natur? Obige Versuche sind bei Anwesenheit von überschüssigen Toluol angestellt, sprechen also für ein Enzym. Bei der Wiederholung der Versuche mit Milchzucker und Stärke bei Anwesenheit von 1 % Fluornatrium und überschüssigem Toluol trat keine Säurebildung ein. Bei Erniedrigung der Toluolmenge auf 0.1 % und sonst unveränderten Verhältnissen war dagegen nach 24 Stunden erhebliche Säurebildung eingetreten. Wir müssen daraus schliessen, dass stärkere Lösungen von Fluornatrium als 0.1 %ige das Enzym lahm legen, während Toluol + 0.1 % Fluornatrium zwar alle Mikroben, welche als Verursacher einer Säuerung etwa in Betracht kommen könnten, an ihrer Wirksamkeit hindern, das Enzym aber nicht, wenn sie

auch nicht abgetötet werden. Vorsichtig angestellte Versuche an Milch ergaben, dass gekochte Milch durch das getrocknete und pulverförmig zugesetzte Ferment nicht schneller verändert wird als ohne diesen Zusatz; bei Versuchen mit dem in flüssiger Form steril zugesetzten Fermente trat dagegen wohl Milchsäurebildung ein.

Ein Versuch mit gelben Lupinensamen wurde doppelt angestellt. Ein Teil der Lupinensamen wurde nach dem Pulverisieren mit Alkohol-Äther kalt entfettet und dabei gleichzeitig die aussen etwa anhängenden Mikroben abgetötet. Alsdann wurde aus beiden Portionen ganz in gleicher Weise das Ferment nach den oben gegebenen Regeln steril gewonnen und durch Beschicken von Agarröhrchen das Fehlen von Keimen in der aus mit Äther-Alkohol behandeltem Samenpulver gewonnenen Enzymlösung nachgewiesen. Nun wurden, von beiden Portionen je 10 ccm zu 1 Messerspitze Milchzucker und je 10 ccm zu etwas Amylumkleister zugesetzt. Zu allen vier Gläschen wurden dann je 10 ccm 0.2 %ige Fluornatriumlösung und 1 ccm Toluol gesetzt. Ebenso wurden blinde Versuche angesetzt. Nach 20stündigem Stehen im Brüteschrank wurden in beiden Portionen, die aus mit Äther-Alkohol behandelten Samen stammten Säuremengen, welche nach Abzug des im blinden Versuche gefundenen Wertes für 10 ccm 8.5 ccm $^1/_{100}$-n. NaOH (bei Milchzucker) und 6.5 ccm $^1/_{100}$-n. NaOH (bei Amylum) entsprachen, zum Neutralisieren verbraucht. Bei den beiden anderen Portionen lagen beide Werte wesentlich höher.

Aus diesem Versuche möchte ich erstens schliessen, dass die viele Stunden hindurch dauernde Einwirkung von Ätheralkohol auf das Lupinenpulver das milchsäurebildende Enzym in seiner Wirkung abgeschwächt hat. Zweitens glaube ich mich berechtigt aus dem Versuche schliessen zu dürfen, dass die beobachtete Milchsäurebildung wirklich durch ein ungeformtes Ferment, also ein Enzym, zustande kommt, dessen Wirkung durch Toluol und 0.1 % Fluornatrium nicht aufgehoben wird.

Es kam nun darauf an, auch mit den blauen Lupinen einen analogen Versuch anzustellen.

A. 100 g zermahlene blaue Lupinen werden 3 ccm, zwecks der Entfettung und Sterilisierung, 15 Minuten hindurch mit einer Mischung aus 500 ccm Alkohol und 100 ccm Äther bei 40° gehalten, dann abfiltriert und der noch alkoholfeuchte Rückstand mit 500 ccm physiol. NaCl unter Zugabe von 5 ccm Toluol über Nacht bei 38° belassen. Dann wird ohne zu pressen filtriert. 100 ccm Filtrat gebrauchen zur Neutralisation 5.2 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH. Dieses Filtrat konnte als an sich steril betrachtet werden. Es diente mir als Kontrolle.

B. 100 g blaue Lupinen werden ebenso behandelt, doch unter Fortfall der Alkoholbehandlung. 100 ccm Filtrat gebrauchen zur Neutralisation 8.1 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH.

Von den neutralen Lösungen A. und B. werden je 10 ccm in Röhrchen abgefüllt, ein Messerspitzchen Kohlehydrat hinzugegeben (M = Milchzucker, St = lösliche Stärke) und 2 Antiseptica. Von Toluol wird soviel zugegeben, dass auf der Flüssigkeitsoberfläche sehr deutlich hiervon noch eine Schicht hält; von NaFl 2 Tropfen einer 10 %igen Lösung, so dass die 10 ccm Lupinenauszug etwa 0.1 % NaFl enthalten. Die Röhrchen werden 18 Stunden bei 38° gehalten, dann jedes in einen Erlenmeyer gespült und noch 3mal mit je 10 ccm $H_2O$ nachgespült. Die gebildete Säure wird mit $^1/_{100}$-n. NaOH titriert (Phenolphtalein als Indikator).

Von Lösung B. wird ein Röhrchen $^1/_2$ Stunde lang auf 56° erhitzt und ein zweites $^1/_2$ Stunde lang auf 70°. Es erfolgte im ersten Falle die Ausflockung von wenig, im zweiten von reichlich Eiweiss.

Von Lösung A. werden ausserdem noch einige Kubikzentimeter bei Arbeiten mit sterilisierten Glasgeräten gewonnen und in einem Agarröhrchen 3 Tage bei 38° gehalten. Während dieser Zeit sind keine Kolonien gewachsen.

**A.**

| | $^1/_{100}$-n. NaOH. |
|---|---|
| 10 ccm Auszug (als Kontrolle) + T . . . . . | 1.8 ccm |
| „ „ „ „ . . . . . | 1.6 „ |
| „ „ „ „ + NaFl . . . . . | 2.2 „ |
| „ „ „ „ „ . . . . . | 2.3 „ |
| „ „ „ „ + Stärke . . . | 4.9 „ |
| „ „ „ „ „ . . . | 4.5 „ |
| „ „ „ „ + NaFl „ . . . | 7.1 „ |
| „ „ „ „ „ „ . . . | 7.0 „ |
| „ „ „ „ + Milchzucker . | 4.2 „ |
| „ „ „ „ „ . | 4.0 „ |
| „ „ „ „ + NaFl „ . | 4.1 „ |
| „ „ „ „ „ „ . | 4.5 „ |

**B.**

| | |
|---|---|
| 10 ccm Auszug bei 56° gehalten + Stärke = | 3.8 ccm $^1/_{100}$-n. NaOH. |
| „ „ „ 70° „ „ = | 0.4 „ „ „ |
| „ „ + T + Stärke . . . . = | 16.4 „ „ „ |
| „ „ + T + NaFl + Stärke . = | 14.8 „ „ „ |

Auch dieser Versuch beweist, dass bei Ausschluss von Mikroben durch einen Auszug von Lupinen Milchsäurebildung erfolgt. Mithin ist für die Samen der gelben, der weissen und der blauen Lupine ein aus Amylum und aus Milchzucker Milchsäure bildendes Enzym erwiesen. Ein diastatisches und ein glykosidspaltendes Ferment hat in der blauen Lupine bereits Wakulenko[1]) in unserm Institute

[1]) Wakulenko, siehe bei R. Kobert, Beiträge zur Kenntnis der vegetabilischen Hämagglutinine, Zweites Heft, Berlin 1913, S. 50. Abdruck aus Bd. 82 dieser Versuchs-Stationen.

nachgewiesen. Das milchsäurebildende ist also das dritte Enzym dieser Samen.

Gleichgültig ob man aus vorstehenden Versuchen auf ein geformtes oder auf ein ungeformtes Ferment schliessen mag, die Tatsache, dass Lupinensamen zu einer starken Milchsäurebildung aus Amylum Anlass geben, bleibt bestehen. Weiteres darüber werden eingehende Untersuchungen unseres Institutes dartun. Mir genügt es, das merkwürdige Faktum dieser exzessiven Säurebildung, wie Kobert sie bei analoger Verarbeitung von etwa 20 anderen Samenarten niemals erhielt, konstatiert zu haben. Es kann kaum einem Zweifel unterliegen, dass im Magendarmkanal der Pflanzenfresser nach Darreichung von besamten Lupinen als Futter diese Säuerung ebenfalls vor sich geht und es ist zu verwundern, dass die Tiere dabei nicht Erscheinungen wie der Mensch bei Säurediabetes bekommen. Jedenfalls erscheint mir der Nutzen der Darreichung von verdünnten Säuren bei Lupinose, der Fröhner das Wort redet, höchst fragwürdig, ja ich glaube, dass bei dem Zustandekommen der Lupinose diese Säurebildung mitwirkt. Vielleicht ist sie sogar die Hauptursache dieser Erkrankung.

## V. Über die Lupinenurease.

Wie T. Takeuchi[1]) gefunden und Kobert durch Wakulenko[2]) hat bestätigen lassen, enthalten die Sojasamen als viertes Enzym eine Urease, d. h. ein Harnstoff hydrolytisch in Ammoniumkarbonat umwandelndes Enzym. Zemplen[3]) fand eine zweite Urease in den Robiniensamen. Wakulenko[4]) bestätigte auch diese Angabe. Er fand, dass beide Ureasen auf Harn stärker einwirken als auf reine Harnstofflösungen. Schittenhelm[5]) erhielt aus den Samen eines dritten Vertreters derselben Pflanzenklasse, nämlich aus den Karolinenbohnen von Glycine frutescens, ebenfalls eine Urease, also eine dritte. Beim Suchen nach andern Papilionaceensamen, die eine ureatische

[1]) T. Takeuchi, Chemiker-Zeitung Jahrg. 35, 1911, S. 408.

[2]) Wakulenko, siehe bei R. Kobert, Beiträge z. Kenntnis der veget. Hämagglutinine, zweites Heft, S. 35.

[3]) C. Zemplén, Ztschr. für angew. Chem. 1912, Heft 31, S. 1560.

[4]) Wakulenko, l. c. S. 31.

[5]) Schitenhelm, zitiert nach H. Euler, General Chemistry of the enzymes (London 1912).

Wirkung entfalten und aus denen sich eine analoge Urease darstellen lässt, kam Kobert auch auf die Lupinensamen. Nachdem er selbst in den Samen der blauen Lupine ein viertes solches Enzym gefunden hatte, liess er durch die Firma E. Merck unter Anlehnung an die Vorschriften von Takeuchi und von Zemplen diese Lupinenurease aus den Samen von Lupinus coeruleus darstellen. Ich selbst konnte mittels dieser bei 38° unter Wahrung der Keimfreiheit die Zersetzung des Harnstoffes sowohl in meinem eigenen Harn als in dem eines normalen Hundes mit Sicherheit nachweisen. Anhangsweise sei an dieses Kapitel über die Lupinenurease noch angeführt, dass in den Lupinensamen, wie Euler berichtet, nach Vines, Abderhalden und Schittenhelm noch ein fünftes Enzym, nämlich ein pflanzliches Erepsin vorkommt, welches Albumosen und Peptone sowie auch Peptide zu Aminosäuren abbaut. Euler nennt dieses Enzym, das auch in Raps, Erbsen und Mais nachweisbar ist, Peptase. Diese Peptase scheint nach Abderhalden und Dammhaus in den ruhenden Samen im Zymogenstadium enthalten zu sein. Mit beginnender Keimung, und zwar vom ersten Tage an, wird dieses Enzym aktiv.

## VI. Über Phasine im allgemeinen und die der Lupine Insonderheit.

Da der Begriff der Phasine in den meisten landwirtschaftlichen Büchern noch gar nicht vorkommt, muss ich, um allgemein verständlich zu werden, etwas weiter ausholen. Man versteht nach Wienhaus[1]) und Kobert[2]) unter Phasinen Substanzen aus Pflanzen (meist Samen), die auf rote Blutkörperchen wie Rizin oder Abrin agglutinierend wirken, die aber innerlich, ja sogar subkutan eingeführt, ungiftig sind.

### 1. Über die Phasine der Papilionaceen und ihre Wirkung im allgemeinen.

Abgesehen von der Sonaceengattung Datura und einigen Euphorbiaceen finden sich nur bei den Papilionaceen Phasine, hier aber reichlich. Die Pflanze, welche der ganzen Gruppe

---

[1]) O. Wienhaus, Biochem. Ztschr. Bd. 18, 1909, Heft 3—5.

[2]) R. Kobert, Beiträge z. Kenntnis der veget. Hämagglutinine, zweites Heft (Berlin 1913), S. 56.

den Namen gegeben hat, ist die Schminkbohne, Phaseolus vulgaris.[1]) Viele von WIENHAUS und KOBERT untersuchten Spielarten enthalten ebenfalls ein Phasin. Weiter gehören hierher die Erbse, die Linse, viele Wickenarten, die Saubohne, die Platterbse, die Erdnuss, die Erderbse, die Caragane, die Glycine, die Robinie, die Sojabohne, die Canavalia ensiformis, die Ormosia coccinea, die Helmbohne d. h. Dolichos Lablab, die Sphenostylis stenocarpa, die Luzerne, der Schafziegerklee, der Honigklee usw. usw. Die meisten der genannten Phasine sind von KOBERT gefunden worden. Es musste selbstverständlich zunächst meine Aufgabe sein, ehe ich in den Lupinen nach neuen Phasinen suchen konnte, mit einigen bekannten einige Versuche zu machen. Einige dieser möchte ich zur Orientierung des Lesers hier einschieben.

Versuch I vom 6. Februar 1912. Phasin aus Phaseolus vulgaris. Das Präparat ist in unserem Institute vor mehr als Jahresfrist dargestellt. Die Lösung ist vor 3 Monaten aus dem Phasinpulver angefertigt worden und hat sich, da sie durch Erhitzen auf 75° sterilisiert war, seitdem klar gehalten. Als Blut wird Plazentarblut, ganz frisch aus der Frauenklinik bezogen, benutzt, und zwar nach dem Defibrinieren 50fach mit physiol. Kochsalzlösung verdünnt. In eine Reihe enger gleichkalibriger Probierröhrchen werden die Proben, je 10 ccm umfassend eingefüllt.

Glas 1 5 ccm Blutgemisch + 5 ccm physiol. ClNa-Lösung als Kontrolle 1,
„ 2 „ „ + 5 ccm, enthaltend 25 mg Phasin
„ 3 „ „ „ „ 20 „ „
„ 4 „ „ „ „ 15 „ „
„ 5 „ „ „ „ 10 „ „
„ 6 „ „ „ „ 5 „ „
„ 7 „ „ „ physiol. ClNa-Lösung als Kontrolle 2.

Schon nach $2^1/_2$ Stunden liegen in Gläschen 2—6 alle Blutkörperchen zusammengeklumpt am Boden und bleiben auf ein Filter gegossen in Form einer siegellackartigen Masse auf dem Filter, während das Filtrat farblos und wasserklar ist. In den Gläschen 1 und 6 sind gar keine Veränderungen eingetreten, nur haben die Blutkörperchen angefangen sich zu setzen. Zusammenballung ist nicht eingetreten. Die Filtration ergibt ein leeres Filter und ein rotes Filtrat.

Ergebnis: Dieser Versuch zeigt, dass 5 mg Phaseolusphasin in 10 ccm Flüssigkeit, also in einer Konzentration von $5:10000 = 1:2000$ schon nach $2^1/_2$ Stunden totale Agglutination von Menschenblut der Plazenta geben. Die untere Grenze für die Wirksamkeit dieses Phasins liegt eben bei noch viel grösserer Verdünnung.

---

[1]) LANDSTEINER und RAUBITSCHEK, Bakt. Centralbl. Bd. 45, 1908, Heft 7.

Versuch 2 vom 5. Februar 1912. Phasinhaltiger Auszug aus einer in Amani in Ostafrika gewachsenen Varietät von Pisum sativum, mit Hilfe von physiol. Kochsalzlösung gewonnen. Die Lösung ist vor 6 Monaten angefertigt worden, hat sich aber ganz klar gehalten. 1 ccm entspricht 1 g Samen. Als Blut dient 50fach verdünntes Blut der menschlichen Placenta.

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas 1 | 5 ccm | Blutgemisch | + 5 ccm | physiol. | Cl Na-Lösung | als | Kontrolle 1, | | | |
| „ 2 | „ | „ | + 5 ccm | enthalt. | Auszug | aus | 1.0 | g | Same, | |
| „ 3 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 0.8 | „ | „ | |
| „ 4 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 0.6 | „ | „ | |
| „ 5 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 0.4 | „ | „ | |
| „ 6 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 0.2 | „ | „ | |
| „ 7 | „ | „ | „ | physiol. | Cl Na-Lösung | als | Kontrolle 2. | | | |

Schon nach $2^1/_2$ Stunden liegen in Gläschen 2—6 alle Blutkörperchen zusammengeklumpt am Boden und bleiben, auf ein Filter gegossen in Form einer siegellackartigen Masse auf dem Filter, während das Filtrat farblos und wasserklar ist. In den Gläschen 1 und 6 sind wie bei Versuch 1 keine Veränderungen eingetreten, die Filtration ergibt rotes Filtrat und ein eeres Filter.

Ergebnis: Dieser Versuch zeigt, dass ein physiol. Kochsalzauszug aus 0.2 g Samen der Varität von Pisum sativum aus Amani genug Phasin enthält um in $2^1/_2$ Stunden sämtliche Blutkörperchen aus 5 ccm 2 %igem Placentarblut bei einer Verdünnung von 1:50, berechnet auf Same, zu agglutinieren.

Zur Umrechnung auf Phasine muss man wissen, wie viel Prozent Ausbeute die betreffende Samenart liefert. Dies war mir in diesem Falle nicht bekannt. Für meine unten folgenden Versuche mit Lupinen habe ich diese wichtige Umrechnung natürlich ausgeführt.

Versuch 3 vom 7. Februar 1912. Phasin aus Canavalia ensiformis, bezogen aus Amani. Die ganz frisch uns gesandten Samen wurden in unserm Institute auf Phasin verarbeitet, der Wasser- und Aschegehalt des gut gepulverten und gleichmässig durchgemischten Präparates festgestellt und bei der Herstellung der Lösung zum Zweck dieses Versuches in Abrechnung gebracht. Die Lösung wird dann so eingestellt, dass 1 ccm 5 mg asche- und wasserfreiem Phasin entspricht. Blut eines Kaninchens, frisch entnommen, defibriniert und 50fach mit physiol. Kochsalzlösung verdünnt.

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas 1 | 5 ccm | Blutgemisch | + 5 ccm | physiol. | Cl Na-Lösung | als | Kontrolle 1, | | |
| „ 2 | „ | „ | + 5 ccm | enthält | 25 | mg | Phasin, | | |
| „ 3 | „ | „ | „ | „ | 15 | „ | „ | | |
| „ 4 | „ | „ | „ | „ | 10 | „ | „ | | |
| „ 5 | „ | „ | „ | „ | 5 | „ | „ | | |
| „ 6 | „ | „ | „ | physiol. | Cl Na-Lösung | als | Kontrolle 2. | | |

Nach 3 Stunden ist in den Gläschen 2—4 totale feste Agglutination erfolgt, während 1 und 6 unverändert geblieben sind. In Glas 5 ist partielle Agglutination, die aber auch nach 24 Stunden nicht total wurde, eingetreten. Der Inhalt der 3 fest agglutinierten Gläschen wird auf einem kleinen Filter gesammelt, in einer kleinen Reibschale mit einem Tropfen Salzsäure verrieben, dann scharf neutralisiert und sofort filtriert und mit physiol. Kochsalzlösung nachgewaschen, bis 4 ccm Filtrat erhalten waren. Dies ist hellgelb. Es wird von neuem zu einem Agglutinationsversuch benutzt, der diesmal mit 2 %igem Plazentarblut angestellt wird.

Glas 7 5 ccm Blutgemisch + 5 ccm physiol. Cl Na-Lösung,
„ 8 „ „ + 2 „ des Filtrates + 3 ccm phys. Cl Na-Lös.,
„ 9 „ „ + 1 „ „ „ + 4 „ „ „
„ 10 „ „ + 5 „ physiol. Cl Na-Lösung.

Nach 3 Stunden war in Glas 8 u. 9 totale feste Agglutination erfolgt.

Ergebnis: Canavalienphasin wirkt noch bei 10 mg zu 10 ccm, d. h. bei 1 : 1000 auf Kaninchenblut total agglutinierend. Aus dem Agglutinat von 3 Gläschen mit 25.15 und 10 mg Phasin liess sich durch Salzsäurebehandlung das verankerte Phasin wieder abspalten und nach dem Neutralisieren klar abfiltrieren. Dies Filtrat wirkte auf Menschenblut agglutinierend. Damit ist bewiesen, dass unser Canavalienphasin nicht artspezifisch wirkt. Dieser Satz gilt für alle Phasine sowie auch für Rizin und für Abrin. Alle diese Stoffe verhalten sich nach dem Freimachen aus einer Blutart gegenüber dieser Blutart nicht anders als gegen andere, d. h. sie haben für andere Blutarten nicht etwa die Fähigkeit der Wirkung eingebüsst. Zum Schluss sei noch hervorgehoben, dass die Verankerung der Phasine an den Blutkörperchen nur am Stroma vor sich geht und nicht am Hämoglobin. Man kann daher auch noch an ausgelaugten fast farblosen Leibern, d. h. an den Stromata Erythrocyten alle Phasinversuche ausführen.

## 2. Über die Wirkung der Phasine auf einige Zellarten von Organen.

Wie KOBERT durch LAU[1]) und REID[2]) hat nachweisen lassen, verankert sich das Rizin nicht etwa nur an Blutkörperchen, sondern in ganz analoger Weise auch an Hirnzellen, Nierenzellen, Dünndarmzellen, weisse Blutkörperchen usw.

---

[1]) FR. LAU, Über veget. Blutagglutinine. Dissert. Rostock 1906.
[2]) GEORGE REID in KOBERT, Beiträge usw., zweiter Teil, S. 81.

Ganz dasselbe gibt, wie Kobert schon durch Wienhaus[1]) hat feststellen lassen, auch für Phasine. Es möge mir gestattet sein, auch über diese merkwürdige Wirkung einige orientierende Versuche, die ich selbst angestellt habe, anzuführen.

Versuch 4 vom 6. Februar 1912. Käufliches Phasin aus Phaseolus vulgaris; blutfreie, gut gewachsene sehr fein suspendierte Leberzellen vom Kaninchen. Sowohl das Phasin ist in physiol. Kochsalzlösung gelöst (1 ccm = 5 mg) als auch die Leberzellen sind in solcher Lösung suspendiert.

1. 5 ccm Leberzellen + 5 ccm ClNa-Lösung als Kontrolle,
2. „ „ „ enthaltend 25 mg Phasin.

Schon nach einer Stunde zeigt sich die Wirkung. In Glas 2 ist Agglutination erfolgt, d. h. die Leberzellen sind scheinbar voluminöser geworden und haben sich rascher am Boden zusammengeballt. Nach Behandlung des auf dem Filter gesammelten Niederschlags mit verd. ClH wird das Filtrat (10 ccm) neutralisiert und je 2 ccm davon zu 2 %igem Kaninchen- und zu 2 %igem Menschenblut (8 ccm) gesetzt. Es erfolgt binnen 6 Stunden totale Agglutination.

Ergebnis: Wie bei den Versuchen mit Blut hat das Bohnenphasin sich zunächst an die Leberzellen verankert und diese zu Boden gerissen. Mittels Salzsäure daraus abgespalten vermag es sodann Kaninchen- und Menschenblut zu agglutinieren.

Versuch 5 vom 6. Februar 1912. Die Leber eines durch Entbluten frisch geschlachteten, kleinen Kaninchens wird mit der Schere in kleine Stückchen geschnitten und diese Stückchen werden in der Reibschale unter langsamem Zusatz von Kochsalzlösung zu einem Brei zerrieben. Dieser Brei wird mit hypisotonischer Kochsalzlösung gewaschen bis er blutfrei ist und dann so lange verdünnt, bis er dünnflüssig ist und dann auf ein Tuch mit engen Maschen gegossen, wobei die am feinsten verteilten Zellen durchgehen, während die gröberen Klumpen und die Bindegewebe auf dem Tuche bleiben.

Die durchgegangene trübe, zellreiche Flüssigkeit hat infolge des Gehaltes an Blutresten zunächst immer noch eine rötliche Farbe. Es wird daher destilliertes Wasser vorsichtig so lange zugesetzt, bis die letzten roten Blutkörperchen anfangen sich aufzulösen. Nun wird das Gefäss sich selbst überlassen, wobei unten sich ein Brei blutfreier Leberzellen bildet, während darüber eine rote Lösung von Hämoglobin steht, die durch Glykogen milchig getrübt ist. Nun wird diese vorsichtig abgegossen und der hämoglobinfreie Bodensatz mit physiol. Kochsalzlösung zu einer milchartigen, ganz blutfreien Flüssigkeit verdünnt. Diese wird zum folgenden Versuch benutzt. Da sie sehr rasch durch Absetzen ihre Konzentration ändert, so muss sie öfter geschüttelt werden. Als Phasin dient ein 6 Monat alter, aber klar gebliebener

[1]) O. Wienhaus, Biochem. Ztschr. Bd. 18, 1909, Heft 3—5.

Auszug aus der schon oben erwähnten, in Amani gezogenen Spielart von Pisum sativum, 1 cm = 0.2 mg Same.

1. 5 ccm Leberzellen + 5 ccm ClNa-Lösung als Kontrolle 1,
2. „ „ „ enthaltend das Lösliche aus 1 g Pisum sativum,
3. „ „ „ ClNa-Lösung als Kontrolle 2,
4. „ „ „ enthaltend das Lösliche aus 1 g Pisum sativum,
5. „ „ „ ClNa-Lösung als Kontrolle 3,
6. „ „ „ enthaltend das Lösliche aus 1 g Pisum sativum.

Nach etwa $^1/_4$ Stunde haben sich in allen Gläschen die Leberzellen zu Boden gesenkt, aber das Volumen der Zellen ist in den drei Gläschen, welche Pisum enthalten, ein etwas grösseres als in den Zellen, welche nichts enthalten. Ferner ist die darüber stehende Flüssigkeit in den drei Normalgläschen deutlich trübe, in den drei Giftgläschen aber durchsichtiger. Es lässt sich also vermuten, dass schon in diesen wenigen Minuten ein Teil des gelösten Phasins des Erbsenauszugs von den Leberzellen abgefangen und verankert ist. Nach mehrfachem Umschütteln werden die Gläschen sich selbst überlassen. 15 Stunden später bemerkt man, dass sich in dem mit dem Auszug aus Pisum sativum Amani beschickten sowie den Kontrollgläsern die Leberzellen zu Boden gesetzt haben. Das Volumen des Bodensatzes in den Kontrollgläsern ist deutlich geringer, als in den Pisum enthaltenden Gläsern. In diesen sind die Zellen durch die Aufnahme des Pisumphasins voluminöser geworden. Die über den Niederschlägen stehenden Flüssigkeiten sind in diesem Versuch in den Kontrollgläsern klarer als in den Pisum enthaltenden Gläsern. Diese Flüssigkeiten werden aus den Gläsern abgehebert und die zu Boden gesunkenen Leberzellen mittels physiol. Kochsalzlösung unter Aufschütteln gewaschen, worauf erneutes Absetzen der Zellen stattfindet. Die abgeheberten Flüssigkeiten werden mittels Pferdeblut auf agglutinierende Eigenschaften untersucht. Die erste abgehobene Flüssigkeit besitzt solche noch deutlich.

Nachdem die phasinhaltigen Leberzellen wiederholt mit Kochsalz auf dem Filter gewaschen worden sind, und nachdem der Nachweis erbracht ist, dass das letzte Filtrat kein Phasin mehr enthielt, wird die Verbindung des Phasins mit den Zellen mittels Salzsäure (2 Tr.) zersetzt und der Brei jetzt mit Kochsalz ausgezogen. Falls verankertes Phasin vorhanden ist, muss dieses jetzt in Lösung gehen und sich im Filtrat befinden. Dieses Filtrat, welches auf 5 ccm gebracht wird, wird neutralisiert, filtriert, sofort mit 1 % Pferdeblutkörperchen versetzt und über Nacht sich selbst überlassen. Früh zeigt sich, dass feste, totale Agglutination eingetreten ist, während eine Kontrollprobe, die nur Pferdeblut und Kochsalz enthält, dies nicht zeigt. Ein Rest des Filtrates der Leberzellen, der nicht verbraucht worden ist, wird früh zu gleichen Teilen mit 2 %iger Kaninchenblutsuspension versetzt. Nach 2 Stunden schon ist auch hier totale, feste Agglutination eingetreten, während sich der Bodensatz in dem Kontrollgläschen leicht aufschütteln lässt.

In der gleichen Weise, wie soeben geschildert, ist der Inhalt der Kontrollgläser (des Leberzellenversuches) behandelt worden. Das erhaltene Filtrat brachte, mit Blutkörperchensuspension in Verbindung gebracht, keine Veränderung derselben hervor. Dieser Versuch zeigt, dass das Phasin eines

selbst 6 Monate alten Erbsenauszuges noch wirksam ist; es wird in kurzer Zeit von Leberzellen abgefangen und verankert. Diese Verankerung lässt sich leicht wieder lösen und dass daraus abgespaltene Phasin bringt nun Blutkörperchensuspension zur Agglutination.

Ergebnis: Es muss als bewiesen gelten, dass das Phasin der Erbsenvarietät aus Amani nicht nur Blutkörperchen agglutiniert, sondern sich auch an Leberzellen verankert. Es gelang, aus den Leberzellen wieder abzuspalten und dann es auf Pferdeblutkörperchen sowie auf Kaninchenblut agglutinierend einwirken zu lassen. Damit ist jeder Zweifel ausgeschlossen, dass das, was wir aus den Leberzellen ausgezogen haben, wirklich das vorher verankerte Phasin war, denn aus den Kontrollzellen liess sich eine derartig wirkende Substanz eben nicht ausziehen.

Versuch 6 vom 6. Februar 1912. Derselbe Auszug aus Pisum sativum von Amani. Schneeweisse Gehirnzellen vom Kaninchen, also ganz hämoglobinfrei.

1. 5 ccm Gehirnzellenbrei + 5 ccm ClNa-Lösung als Kontrolle 1,
2. „ „ „ enthaltend Auszug aus 1000 mg Same,
3. „ „ „ „ „ „ 800 „ „
4. „ „ „ „ „ „ 600 „ „
5. „ „ „ „ „ „ 400 „ „
6. „ „ „ „ „ „ 200 „ „
7. „ „ „ ClNa-Lösung als Kontrolle 2.

Nach Umschütteln zeigte sich bald in den Pisum enthaltenden Gläschen eine leichte Flockenbildung, die nach $^1/_4$ Stunde bedeutend wurde und einen Satz von Gehirnzellen am Boden der Gläser bildete. An den Kontrollgläsern war erst nach längerer Zeit eine Trübung und erst noch später ein Bodensatz zu bemerken. Das Volumen der gesenkten Gehirnzellen ist ein grösseres in den Gläsern, die Pisum enthalten, als in den Kontrollgläsern.

Es zeigte sich weiter wie in Versuch 2, dass auch noch nach 15 Stunden der Bodensatz von Gehirnzellen in den Gläsern mit Pisumphasin infolge von Volumzunahme der Zellen ein grösserer war. Es handelte sich also nicht etwa nur um schnelleres Niederfallen der Gehirnzellen in den Pisumgläschen. Nach genügender Waschung der Hirnzellen mit ClNa-Lösung wird das Phasin von den Zellen durch Salzsäure abgespalten. Nach Neutralisation werden einem Teile des abfiltrierten neutralisierten Phasins Pferdeblutkörperchen und einem anderen Teile Kaninchenblut zugesetzt. Schon nach 2 Stunden ist in den das Filtrat enthaltenden Gläsern Agglutination eingetreten, während die Blutkörperchen in den Kontrollgläsern einzeln geblieben sind.

Ergebnis: Das für Leberzellen gewonnene Resultat gilt auch für Hirnzellen. Beide Zellsorten entziehen der Zwischenflüssigkeit das Phasin und verankern es unter Volumzunahme. Aus den gewaschenen Zellen lässt sich durch ClH das Phasin wieder herauslösen und wirkt nun z. B. auf Pferdeblutkörperchen und auf Kaninchenblut agglutinierend.

Wir sehen also, dass die Phasine verschiedener Papilionaceen sich mit isolierten gewaschenen Zellen verschiedener Organe verbinden und aus diesen Verbindungen wieder frei gemacht werden können. Dies ist eine Bestätigung der Angaben von KOBERT,[1]) WAKULENKO,[2]) REID,[3]) SOMMERFELD.[4]) Ob auch in den Lupinen ein solches Phasin enthalten ist, soll das folgende Kapitel uns zeigen.

### 3. Über das Phasin von Lupinus coeruleus.

Die blaue Lupine, Lupinus angustifolius *L.*, hier von mir mit dem Handelsnamen Lupinus coeruleus bezeichnet, wurde in folgender Weise verarbeitet. 100 g frische trockene Samen wurden gemahlen und unter Zusatz von 2 ccm Toluol mit 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung und häufigem Umschütteln und Neutralisieren bei 38° C. 12 Stunden lang digeriert. Die Flüssigkeit wurde dann durch ein Tuch gegossen, filtriert und mit Alkohol in etwa gleichem Volumen gefällt. Der Niederschlag wurde möglichst rasch gesammelt und wieder gelöst, so dass 1 ccm der gewonnenen Lösung das Phasin aus 1 g Samen enthielt. Wieviel dies ist, wurde in einigen besonderen Versuchen festgestellt. Für die blaue Lupine ergab sich dabei durchschnittlich 37.5 mg aschefrei gerechnetes Phasin aus 1 g Samenpulver. Der Aschengehalt des Präparates betrug im Durchschnitt 11.6 %, der Gehalt an Wasser 11.2 % und der an unlöslichem Phasin[5]) 4.9 %, was bei der Berechnung auf reines Phasin in Abzug kam.

Es wurden von mir die verschiedensten Blutarten, serumhaltig und serumfrei fast stets in 2 %iger physiologischer Kochsalzlösung der Wirkung des Phasins ausgesetzt. Die Versuche waren derartig eingerichtet, dass in eine Reihe von meist sieben Reagenzgläschen je 5 ccm 2 %ige Blutsuspension, dazu dann die Phasinlösung kam, die durch Zusatz von 0.9 %iger NaCl-

---

[1]) R. KOBERT, Beiträge zur Kenntnis der vegetabilischen Hämagglutinine (Berlin 1913). Erster Teil.

[2]) WAKULENKO, ebenda. Zweiter Teil, S. 1.

[3]) G. REID, ebenda. Zweiter Teil, S. 82.

[4]) SOMMERFELD, ebenda. Zweiter Teil, S. 103.

[5]) Durch die Alkoholbehandlung wird stets ein Teil denaturiert, unlöslich und unwirksam gemacht. Diesen muss man natürlich in Abrechnung bringen.

Lösung auf das Volumen von 5 ccm gebracht wurde, so dass im ganzen stets 10 ccm vorhanden waren, und die Blutverdünnung 1 %ig wurde. Vorsichtig wurde jedes Gläschen einmal umgeschüttelt und dann bei Stubentemperatur unberührt stehen gelassen. 2 Gläser enthielten stets neben 5 ccm Blutgemisch nur 5 ccm physiologische Kochsalzlösung; sie dienten als Kontrollen. So wurde sowohl der Rohauszug aus den Lupinensamen, eine opaleszierende Flüssigkeit, wie die gereinigte Phasinlösung in wechselnder Konzentration natürlich immer bei neutraler Reaktion geprüft. Bis 24 Stunden wurde beobachtet. Trotz der über Monate sich hinziehenden zahlreichen Versuche und Nachversuche war es nicht möglich, in jedem Falle ein völlig sicheres Resultat zu erzielen. Alle Versuche, in denen die Kontrollgläschen Veränderungen und Insonderheit Autoagglutination zeigten, wurden selbstverständlich unberücksichtigt gelassen.

Ich berichte nun über die Beeinflussung der einzelnen Blutarten, wobei ich die Grenzzahlen der totalen Agglutination durch fetten Druck hervorhebe.

1. **Pferdeblut,** das an sich grosse Neigung zu sogen. Auto-Agglutination hat, wurde in allen Versuchen spezifisch agglutiniert. Die untere Grenze der Wirksamkeit fand ich bei **1 : 1333.**

Um ein Bild von der Versuchsanordnung zu geben, lasse ich einen Versuch folgen:

Phasin des durch Alkohol gereinigten Auszugs aus der blauen Lupine.
1 ccm = 0.2 g Samen-Substanz = 7.5 mg Phasin.

16. Januar 1913. Pferdeblutkörperchen 1 %ig.

| | | |
|---|---|---|
| I. | 5 ccm Blutgemisch + 5 ccm | NaCl-Lösung als Kontrolle, |
| II. | „ „ „ | enthaltend Auszug aus 1 g Substanz, |
| III. | „ „ „ „ „ | „ 0.8 „ „ |
| IV. | „ „ „ „ „ | „ 0.6 „ „ |
| V. | „ „ „ „ „ | „ 0.4 „ „ |
| VI. | „ „ „ „ „ | „ 0.2 „ „ |
| VII. | „ „ „ | NaCl-Lösung als Kontrolle. |

Aufgestellt 9 Uhr 45 Minuten.

Um 4 Uhr in allen Gläsern, die Phasin enthalten, deutliche Agglutination, die dann über Nacht eine vollständige wird. Die Blutkörperchen haben am Boden der Gläser durch Agglutination eine feste Scheibe gebildet, die sich beim Schütteln nicht in einzelne Blutkörperchen zerteilen lässt, während die Blutkörperchen in den Kontrollgläsern alle noch einzeln sind

und sich durch Aufschütteln völlig zerteilen lassen, so dass der frühere Zustand wieder hergestellt werden kann.

Ergebnis: 1. Das Phasin der blauen Lupine wirkt bei 0.2 g Samenauszug: 10 ccm auf 1 % ige Pferdeblutkörperchensuspension total fest agglutinierend. Auf reines Phasin umgerechnet ergibt dies 7.5 : 10000 = 75 : 100000 = 1 : 1333.

2. Auf das ungemein unempfindliche **Hammelblut** wirkt das Phasin der blauen Lupine dennoch ein. Es wurde allerdings nur bei starker Konzentration, nämlich nur noch bei 40 : 10000 = **1 : 250**, total agglutiniert.

3. **Kalbsblut** blieb durch das Phasin aus Lupinus coeruleus bei grossen, mittleren und kleinen Dosen (1 : 10, 1 : 53 und 1 : 1333) unbeeinflusst.

4. Dagegen wurde **Rinderblut** in mehreren Fällen bei **1 : 270** bis **1 : 333** total agglutiniert. In einigen Versuchen war keine Wirkung zu erzielen; es wird sich hier aber wohl um Kalbsblut gehandelt haben, das vom Schlachthof mitunter als Rinderblut ausgegeben wird. In zwei solchen Fällen wurde bei grossen Dosen sogar umgekehrt Hämolyse erzielt (bei 1 : 10).

5. Das meist sehr unempfindliche **Ziegenblut** reagierte auf das Phasin der blauen Lupine mit Hämolyse noch bei 0.4 : 10.0 = 1 : 25 bezogen auf Samen, oder auf Phasin umgerechnet bei 1 : 666.

6. Sehr wechselnd war das Verhalten von **Hundeblut** dem Phasin der blauen Lupine gegenüber. Während wir mit dem 1912 dargestellten Phasin negative Resultate erhielten, ergab das 1913 zubereitete Agglutination. In 2 Versuchen erzielten wir bei starker Konzentration, nämlich bei 1 : 200, auf Blutkörperchen totale Hämolyse. Wovon dies wechselnde Verhalten abhängt, war nicht zu ergründen.

7. Beim **Menschenblut,** das wir als frisches Plazentarblut zu zahlreichen Versuchen verwandten, liess sich mit Samenauszug und reinem Phasin Agglutination bis zu einer Konzentration von **1 : 1333** feststellen, während hohe Dosen 1 : 10 bis 1 : 200 totale Hämolyse ergaben.

8. Sehr zahlreich waren die Versuche auch mit **Katzenblut** bezw. Blutkörperchen. Es wurde fast durchweg durch das Phasin der blauen Lupine total agglutiniert. Die untere Grenze betrug **1 : 1666.** Hohe Dosen (1 : 10 bis 1 : 270) lösten die Blutkörperchen.

9. Auf **Kaninchenblut** wirkte das Phasin der blauen Lupine in der grossen Mehrzahl der Versuche total agglutinierend. Ein Phasin, welches bereits 6 Monate gestanden hatte, wirkte noch in einer Konzentration von **1 : 1000.** Ein 1913 dargestelltes Phasin erzeugte bei 1 : 800 Agglutination, dagegen Hämolyse bei 1 : 200. In zwei Fällen blieb das Ergebnis negativ.

10. Hohe Dosen (1 : 10) des Phasins hämolysierten **Taubenblut,** geringe agglutinierten. Die Grenze der Agglutinationswirkung fand sich bei **1 : 1333.**

11. **Rattenblut** wurde durch das 1912 dargestellte Phasin agglutiniert — die untere Grenze war **1 : 714,** in einem Falle trat bei höherer Dose, nämlich bei 1 : 310, Hämolyse ein. Ein 1913 dargestelltes Phasinpräparat lies das Blut ziemlich unbeeinflusst.

12. Auch bei **Meerschweinchenblut** waren die Resultate widersprechend. Die Mehrzahl der Versuche brachte Hämolyse, die sogar in einer Verdünnung von 1 : 1333 eintrat. In einigen agglutinierte das Phasin die Blutkörperchen bis zu einer Konzentration von **1 : 714.** Ein 1912 dargestelltes Phasin ergab ein negatives Resultat.

13. Beim **Schweineblut** zeigte sich nur in einem Falle Agglutination, während in den anderen Versuchen jede Einwirkung ausblieb.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Blutarten trat also bei gewisser Konzentration durch das Phasin der blauen Lupine Agglutination ein, am konstantesten und stärksten beim Pferdeblut. Grössere Dosen wirkten z. T. hämolytisch.

### 4. Über das Phasin aus Lupinus luteus.

Die Samen der gelben Lupine, Lupinus luteus *L.*, wurden von mir in gleicher Weise wie die von Lupinus coeruleus nach der Phasinmethode verarbeitet. Es entwickelte sich dabei stets nebenbei eine beträchtliche Menge Milchsäure. Um diese auszuschalten, wurde der Auszug mit Alkohol gefällt und das gefällte Phasin rasch wieder gelöst; 1 ccm Lösung entsprach 0.2 g Same und enthielt 10 mg Phasin. Bei der Berechnung auf reines Phasin wurde das unlösliche Phasin in einer Menge von 9.8 %, ferner 10.3 % Wasser und 8.0 % Asche abgezogen.

Über die damit angestellten Blutversuche berichte ich summarisch.

1. Auf **Hundeblut** übte das Phasin der gelben Lupine in mehreren Versuchen gar keine Wirkung aus, in anderen dagegen war eine typische Hämolyse, die in einem Falle — es handelte sich allerdings hier um das Blut eines narkotisierten Hundes — als untere Grenze 1 : 1562 ergab.

2. Auch beim **Meerschweinchenblut** waren die Ergebnisse widersprechend, indem bei einigen Versuchen gar keine Wirkung eintrat, in anderen dagegen Hämolyse. In einem Falle wurde das Blut bei einer Phasindosis von 1 : 200 agglutiniert.

3. und 4. Auf **Rinderblut** und **Schweineblut** wirkte das in dem Originalauszug enthaltene Phasin bei einer Konzentration von 1 : 625 agglutinierend, das Phasin dagegen ergab bei beiden Blutarten in allen Versuchen ein negatives Resultat. Es scheint daher, als ob das Phasin der gelben Lupine durch die Fällung mit dem in diesem Falle 4 fachen Volumen Alkohol unwirksam wird, wenigstens was Rinder- und Schweineblut betrifft.

5. **Rattenblut** wurde durch das Phasin in mittleren Dosen (1 : 200) total hämolysiert. Hohe und ganz geringe Dosen hatten keine Wirkung.

6. **Katzenblut** bezw. -blutkörperchen wurden fast in allen Versuchen total hämolysiert. Die untere Grenze der Wirkung war 1 : 625.

7. **Menschliches Plazentarblut** wurde von dem Phasin der gelben Lupine in den meisten Versuchen garnicht angegriffen, in einigen dagegen war bei maximalen Dosen (1 : 125 und 1 : 250) eine totale Agglutination zu beobachten. Ein im Jahre 1913 dargestelltes Phasin löste die Blutkörperchen auf in einer Konzentration von 1 : 200.

8. **Puterblut** wurde durch den Originalauszug aus den gelben Lupinen agglutiniert (1 : 125), dagegen hatte das Phasin in derselben Konzentration auf dasselbe Blut gar keine Wirkung.

9. Auf **Hühnerblutkörperchen** fand selbst bei hohen Dosen (1 : 100) keine Wirkung, also weder agglutinierende noch hämolysierende statt.

10. Auf das **Kaninchenblut** war mit dem 1912 dargestellten Phasin keine Wirkung zu erzielen, während ein 1913 isoliertes

in derselben Konzentration (1 : 200) total hämolysierend wirkte. Bei weiterer Verdünnung ging aber die hämolysierende Kraft rasch verloren.

11. Mit **Hammelblut** ergaben die Versuche in einem Falle ein negatives Resultat, während in einem anderen eine teilweise Ausflockung zu bemerken war.

12. Auch auf **Pferdeblut** war nicht mit absoluter Sicherheit die Wirkung unseres Phasins festzustellen. Während in einem Versuche in einer Konzentration von 1 : 250 eine typische Agglutination zu verzeichnen war, zeigte sich in einem anderen teilweise Hämolyse.

Ein Phasin der gelben Lupine existiert demnach überhaupt nicht. Die nach Phasinart gewonnene Substanz hat keine sicher agglutinierenden Wirkungen, auch nicht auf das Blut einer einzigen Tierart.

### 5. Über das Phasin aus Lupinus albus.

Das Phasin wurde nach der bekannten Phasinmethode dargestellt. Es entwickelte sich auch bei dieser Lupine eine grosse Menge Milchsäure, die neutralisiert wurde. Das Phasin wurde so gelöst, dass 1 ccm Lösung einer Samenmenge von 0.2 g, das 7 mg Phasin enthält, entspricht. Von dem benutzten Phasinpräparat war 4.6 % Phasin unlöslich, der Aschegehalt betrug 12 %, der an Wasser 11.7 %.

Ich führe auch hier die Ergebnisse nur summarisch an.

1. Auf **Rinderblut** wurde mit dem Phasin der weissen Lupine in allen Versuchen, die zu verschiedenen Zeiten und Präparaten ausgeführt wurden, keine Wirkung wahrgenommen.

2. In mittleren Dosen wirkte das Phasin der weissen Lupine auf **Rattenblutkörperchen** total hämolysierend, während maximale und geringe das Blut intakt liessen.

3. Bei **Pferdeblutkörperchen** erfolgte bei Einwirkung des Originalauszugs der weissen Lupine eine teilweise Ausflockung, die noch in einer Konzentration von 1 : 1428, auf Phasin gerechnet, eintrat.

4. **Hundeblut** wurde durch das Phasin der weissen Lupine in der Mehrzahl der Versuche total hämolysiert. Die untere Grenze fand ich — freilich mit dem Blute eines narkotisierten Hundes — bei 1 : 2380. Die anderen Versuche gaben ein negatives Resultat.

5. Ebensowenig eindeutig waren die Ergebnisse der Versuche mit **Meerschweinchenblut.** Es erfolgte in der Hälfte der Versuche Hämolyse bis zu einer Verdünnung von 1:1428, während sonst mit Ausnahme eines einzigen Versuchs, der Agglutination ergab, keine Einwirkung zu erzielen war.

6. und 7. Dasselbe Schwanken zwischen Agglutination, Hämolyse und gar keiner Beeinflussung zeigten **Kaninchen-** und **Katzenblut.**

8. Auch auf **Menschenblut** war die Wirkung des Phasins eine ganz inkonstante. Sie variierte ebenfalls zwischen Agglutination, Hämolyse und gar keiner Beeinflussung.

9. Die Versuche mit **Hammelblut** ergaben bei 1:285 eine teilweise Ausflockung.

10. Bei **Puterblut** bewirkte das Phasin der weissen Lupine bei 1:476 eine teilweise Ausflockung.

Ein Phasin ist also in der weissen Lupine ebensowenig sicher gestellt als in der gelben, während für die blaue ein solches wenigstens für die Mehrzahl der Blutarten nachweisbar ist.

## Gesamtergebnis.

1. Die Samen der blauen, der gelben und der weissen Lupine sind fermentreich. Neben einem diastatischen, einem glykosidspaltenden, einem peptonspaltenden und einem harnstoffumwandelnden Enzym enthalten sie ein bisher übersehenes, aus Amylum und mehreren Zuckerarten Milchsäure bildendes, das technische und toxikologische Bedeutung haben dürfte. Weiteres über die Verwendung dieses Enzyms zur Herstellung z. B. von alkoholarmen Getränken behält sich unser Institut vor.

2. In den Samen der blauen Lupine ist ferner noch ein ungiftiges agglutinierendes Enzym, also ein Phasin im Sinne von Wienhaus und Kobert enthalten. Bei Untersuchung von Futtermitteln auf Rizinusbeimischung ist diese Tatsache nicht ausser acht zu lassen. Erhitzen auf 70—75° macht es rasch unwirksam und verstattet leicht seine Unterscheidung von Rizin. Was für ein Stoff statt des Phasins in der weissen und gelben Lupine vorhanden ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

# Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Gustav Otto Muenk, evangelischer Konfession, als Sohn des verstorbenen Rektors Gustav Muenk am 2. Juni 1888 zu Bünde in Westfalen. Von meinem Vater vorbereitet, besuchte ich die dortige höhere Knabenschule. Von Ostern 1903 erhielt ich meine weitere Ausbildung auf dem König Wilhelms-Gymnasium zu Höxter a. d. W., das ich Herbst 1908 mit dem Reifezeugnis verliess. Ich studierte hierauf die ersten drei Semester in Berlin, die folgenden beiden in Rostock, an deren Ende ich die ärztliche Vorprüfung bestand. Nach einem einsemestrigen Aufenthalt in Würzburg war ich wiederum in Rostock immatrikuliert, wo ich am 18. Dezember 1913 mein Staatsexamen bestand.